






Modulation of the transcription of pro-inflammatory gene products

Patent number: DE10059144
Publication date: 2002-07-04
Inventor: HECKER MARKUS (DE); WAGNER ANDREAS H (DE)
Applicant: HECKER MARKUS (DE); WAGNER ANDREAS H (DE)
Classification:
- **international:** C12N15/11; C07H21/00; A61K31/711
- **european:** C12N15/11B
Application number: DE20001059144 20001129
Priority number(s): DE20001059144 20001129; DE20001049549 20001006

Also published as:

 WO0229044 (A3)
 WO0229044 (A2)
 US2004048820 (A1)
 CN1468305 (A)
 CA2424604 (A1)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for DE10059144

Abstract of corresponding document: **US2004048820**

The present invention refers to inhibitors of the transcription factors IRF-1, their use as therapeutic agents as well as their use for prevention and therapy of cardiovascular complications like re-stenosis after percutaneous angioplasty or stenosis of venous bypasses, chronic (transplant arteriosclerosis or vasculopathy) or acute transplant rejection, graft versus host disease (GVHD), immunological hypersensitivity reactions (allergies), particularly bronchial asthma and atopic dermatitis, chronic recurrent inflammatory diseases, particularly ulcerative colitis and Crohn's disease, psoriasis and sarcoidosis, as well as autoimmune diseases, particularly diabetes mellitus, multiple sclerosis, collagenoses (e. g. systemic lupus erythematoses), rheumatoid arthritis and vasculotids.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 100 59 144 A 1**

51 Int. Cl.⁷:
C 12 N 15/11
C 07 H 21/00
A 61 K 31/711

21 Aktenzeichen: 100 59 144.2
22 Anmeldetag: 29. 11. 2000
43 Offenlegungstag: 4. 7. 2002

DE 100 59 144 A 1

71 Anmelder:
Hecker, Markus, Prof.Dr., 37075 Göttingen, DE;
Wagner, Andreas H., 37083 Göttingen, DE
74 Vertreter:
Dehmel & Bettenhausen, Patentanwälte, 80469
München

61 Zusatz zu: 100 49 549.4
72 Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Modulation der Transkription pro-inflammatorischer Genprodukte

57 Die vorliegende Erfindung betrifft Inhibitoren des Transkriptionsfaktors IRF-1, deren Verwendung als therapeutisches Mittel sowie deren Verwendung zur Prävention oder Therapie von chronischen (Transplantat-Arteriosklerose oder Vaskulopathie) oder akuten Transplantatabstoßungen, chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen, insbesondere Asthma bronchiale, atopische Dermatitis, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Psoriasis und Sarkoidose, sowie Autoimmunerkrankungen, insbesondere Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Kollagenosen (z. B. systemischer Lupus erythematodes), rheumatoide Arthritis und Vaskulitiden.

DE 100 59 144 A 1

- [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Inhibitoren des Transkriptionsfaktors IRF-1, deren Verwendung als therapeutisches Mittel sowie deren Verwendung zur Prävention oder Therapie von chronischen (Transplantat-Arteriosklerose oder Vaskulopathie) oder akuten Transplantatabstoßungen, chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen, insbesondere Asthma bronchiale, atopische Dermatitis, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Psoriasis und Sarkoidose, sowie Autoimmunerkrankungen, insbesondere Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Kollagenosen (z. B. systemischer Lupus erythematodes), rheumatoide Arthritis und Vaskulitiden.
- [0002] Das Gefäßendothel nimmt eine Schlüsselstellung bei Entzündungserkrankungen ein, da es den primären Interaktionsort zirkulierender entzündungskompetenter Zellen mit dem Gewebe darstellt. So sind vielfältige Wechselwirkungen von Endothelzellen mit Monozyten und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten bei akuten oder chronischen Entzündungen beschrieben. In letzter Zeit wird auch die Interaktion von Endothelzellen mit proinflammatorischen T-Helferzellen (TH1) bei Autoimmunerkrankungen (z. B. Vaskulitiden), bei der Transplantat-Vaskulopathie und Arteriosklerose ebenso wie bei chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen (z. B. Morbus Crohn) verstärkt diskutiert. Dabei kommunizieren Lymphozyten und Endothelzellen über das CD40/CD154-Rezeptor/Ligand-System (auch als TNF-Rezeptor/Ligand-5-System bezeichnet) mit konsekutiver Steigerung der Chemokin- und Adhäsionsmolekülexpression im Endothel. Darüber hinaus setzen die Endothelzellen, im Gegensatz zu anderen antigenpräsentierenden Zellen wie z. B. Monozyten, offenbar nur nach Aktivierung des CD40-Signalweges biologisch aktives Interleukin-12 in einer Menge frei, die der maximal stimulierter Monozyten gleichkommt (diese gelten gemeinhin als Hauptquelle für Interleukin-12). Interleukin-12 ist der wichtigste Stimulus bzw. Differenzierungsfaktor für naive T-Helferzellen, die mit einer verstärkten Bildung von Interferon- γ bzw. Expression von CD154 auf ihrer Oberfläche reagieren (diese T-Helferzellen gelten dann als TH1-Zellen). Interferon- γ seinerseits verstärkt die Expression von CD40 in den Endothelzellen, so dass es zu einem Teufelskreis kommt, bei dem sich Endothelzellen, T-Helferzellen und rekrutierte Monozyten gegenseitig stimulieren und die Entzündungsreaktion in Gang halten.
- [0003] Die Entzündungsreaktion auslösenden ko-stimulatorischen Eigenschaften von CD40/CD154 wurden u. a. bei der akuten bzw. chronischen Transplantatabstoßung (Vaskulopathie) sowie beim Morbus Crohn tierexperimentell nachgewiesen. Dabei spielt jedoch nicht nur die Endothel-Leukozyten-Wechselwirkung über CD40/CD154, sondern auch z. B. die CD40/CD154-vermittelte Interaktion von Monozyten/Makrophagen oder dendritischen Zellen mit TH1-Zellen bzw. naiven T-Helferzellen eine Rolle. Ferner können z. B. glatte Gefäßmuskelzellen aber auch Keratinozyten der Haut oder synoviale Fibroblasten in Gelenken CD40 exprimieren. Die Aktivierung des CD40-Signalweges in diesen Zellen ist ebenfalls von Bedeutung nicht nur für die Entzündungsreaktion, sondern führt auch zu Umstrukturierungsprozessen im Gewebe wie z. B. dem Remodelling der Gefäßwand bei der Transplantat-Vaskulopathie, den Hautveränderungen bei der Psoriasis oder den Erosionen des Gelenkknorpels bei der rheumatoiden Arthritis. Neben den CD154-induzierten, Interleukin-12-abhängigen und TH1-vermittelten chronischen Entzündungserkrankungen bzw. Autoimmunreaktionen, zu denen auch Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Sarkoidose und Vaskulitiden zählen, sind die ko-stimulatorischen Eigenschaften von CD40/CD154 wichtig für die Differenzierung von B-Lymphozyten in Antikörper-produzierende Plasmazellen, die durch den Kontakt mit TH2-Zellen ausgelöst wird. Dabei exprimieren die B-Lymphozyten CD40, die TH2-Zellen CD154. Ohne diese Ko-Stimulation produzieren die Plasmazellen primär Antikörper vom Typ IgM und kaum Antikörper vom Typ IgE oder IgG. Eine übersteigerte TH2-Antwort, d. h. die übermäßige Produktion von Antikörpern des Typs IgE und IgG spielt eine wichtige Rolle bei primär allergisch bedingten, chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen wie Asthma bronchiale, atopische Dermatitis und Colitis ulcerosa, aber auch bei Kollagenosen wie systemischer Lupus erythematodes (SLE), wobei beim SLE die Bildung autoreaktiver Autoantikörper im Vordergrund steht und dieser insofern als generalisierte Autoimmunerkrankung betrachtet wird. Generell ist die Unterscheidung zwischen Autoimmunerkrankungen und chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen problematisch, da ein gemeinsamer prädisponierender Faktor offenbar das Ungleichgewicht zwischen einer TH1- und einer TH2-vermittelten zellulären bzw. humoralen Immunantwort ist.
- [0004] Den derzeit einzig sinnvollen Therapieansatz für die Behandlung der mit dem CD40/CD154 Signalweg assoziierten Erkrankungen stellt neben blockierenden Antikörpern gegen CD154 die Inhibierung der CD40-Expression in den CD154-Zielzellen dar. Ein Nachteil der Anti-CD154-Antikörperbehandlung besteht unter anderem in der Gefahr von Überempfindlichkeitsreaktionen (gegen den Antikörper), vor allem bei wiederholter Applikation sowie die zumindest für gewebeständige Epitope (z. B. infiltrierte T-Lymphozyten) schlechte Zugänglichkeit, da die Antikörper in der Regel über die Blutbahn appliziert werden müssen. Allerdings gibt es, wie für viele andere Zytokinrezeptoren auch, keine niedermolekularen Rezeptorantagonisten für CD40. Ferner aktivieren aufgrund der Trimerisierung des Rezeptormoleküls nach Ligandenbindung CD40-Antikörper eher die CD154-Zielzellen. Andere sich von einer allgemeinen Dämpfung der Entzündungsreaktion abgrenzenden Strategien sind die Stimulation der TH1-Zellantwort bei Überwiegen einer TH2-Zellreaktion (z. B. durch die Gabe von einem TH1-Zytokin wie Interferon- γ) oder umgekehrt durch die Stimulation der TH2-Zellantwort bei Überwiegen einer TH1-Zellreaktion (z. B. durch Gabe von einem TH2-Zytokin wie Interleukin-10). Da sich die Reaktionen der T-Helferzellen Zytokin-vermittelt antagonisieren (d. h., ein Überwiegen der TH1-Zellantwort führt zur Dämpfung der TH2-Zellantwort und umgekehrt), bergen diese Strategien aber die Gefahr in sich, den jeweils anderen Arm der T-Helferzellantwort zu enthemmen, mit der Möglichkeit, eine dementsprechende andersartige Entzündungsreaktion auszubilden.
- [0005] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde Mittel für eine Prävention und/oder Therapie von CD40/CD154-assoziierten Erkrankungen zur Verfügung zu stellen.
- [0006] Die Aufgabe wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.
- [0007] Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:
- [0008] Fig. 1 zeigt in einer Grafik das Ergebnis der CD40 mRNA-Expression in nicht-stimulierten, TNF α (1000 U/ml), IFN γ (1000 U/ml) und TNF α (100 U/ml) plus IFN γ (1000 U/ml)-stimulierten kultivierten humanen Endothelzellen nach 9 Stunden (bezogen in % auf die basale CD40-Expression in nicht-stimulierten Endothelzellen) (n = 5-9,

*P < 0,05 versus basal, † P < 0,05 versus TNF α und IFN γ .

[0009] Fig. 2 zeigt schematisch das Ergebnis der Zeit-abhängigen Zunahme der nukleären Verschiebung von NF κ B (p65/p50 Heterodimer), des p91/p91 Homodimers von Stat-1 und von IRF-1 in humanen Endothelzellen, die 0,5 Stunden (NF κ B und Stat-1) und 3 Stunden (IRF-1) mit TNF α (1000 U/ml), IFN γ (1000 U/ml) und TNF α (100 U/ml) plus IFN γ (1000 U/ml) inkubiert wurden. Eine Vorinkubation (1 Stunde) mit Cycloheximid (Cx, 1 μ M) zeigt, dass IRF-1 de novo exprimiert wird. Repräsentativer EMSA, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten.

[0010] Fig. 3 zeigt schematisch die Ergebnisse der Auswirkungen von spezifischen Decoy-ODN gegen Stat-1, NF κ B und IRF-1 (10 μ M, 4 h Vorinkubation) auf (a) den Reichtum an CD40 mRNA (n = 3–5, statistische Zusammenfassung, bezogen in % auf den Maximalwert, *P < 0,05 versus TNF α /IFN γ), (b) den Reichtum an CD40 und E-Selectin mRNA (repräsentative RT-PCR, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten), (c) den Reichtum an CD40 Protein (repräsentativer Western Blot, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten) in humanen Endothelzellen, die für 9 Stunden (RT-PCR) bzw. 24 Stunden (Western Blot) mit TNF α (100 U/ml)/IFN γ (1000 U/ml) inkubiert wurden. Bei (b, c) sind die relativen Intensitäten (%), bestimmt durch densitometrische Auswertung (One-Scan-Gel Analysis Software, Scanalytics, Billerica, MA, USA), bezogen auf die Maximalwerte bei Zytokin-Stimulation angegeben.

[0011] Fig. 4 zeigt schematisch die Ergebnisse der Auswirkungen von spezifischen Decoy-ODN gegen Stat-1, NF κ B und IRF-1 (10 μ M, 4 h Vorinkubation) auf den Reichtum an CD40 Protein (a) bestimmt mit Hilfe von Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) in humanen Endothelzellen, die für 24 Stunden mit TNF α (100 U/ml)/IFN γ (1000 U/ml) inkubiert wurden und den Nachweis des für Endothelzellen charakteristischen Zelloberflächenproteins PECAM-1 (b). Dargestellt ist jeweils ein Overlay der Originalmessung der IgG Isotypkontrolle und von TNF α /IFN γ -behandelten (CD40) bzw. nicht-stimulierten (PECAM-1) Zellen und in tabellarischer Form die logarithmischen Werte der jeweiligen durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten. Repräsentativer Versuch, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten.

[0012] Fig. 5 zeigt schematisch die Ergebnisse der Auswirkungen von TNF α (2000 U/ml), IFN γ (1000 U/ml) und TNF α (100 U/ml) plus IFN γ (1000 U/ml) auf den Reichtum an CD40 und IRF-1 mRNA in humanen Endothelzellen nach 9 Stunden Inkubation. Repräsentativer Versuch, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten.

[0013] Fig. 6 zeigt schematisch die Ergebnisse der Zeit-abhängigen Zunahme des Reichtums an CD40 und IRF-1 mRNA in humanen Endothelzellen, die für 0, 0,5, 1,5, 3 und 9 Stunden mit IFN γ (1000 U/ml) inkubiert wurden. Repräsentativer Versuch, vergleichbare Ergebnisse wurden in weiteren Experimenten erhalten.

[0014] Fig. 7 zeigt schematisch die Ergebnisse der Auswirkungen von einem spezifischen (a) Antisense-Oligonukleotid (IRF-1AS, 0,2 μ M, 5 Stunden Vorinkubation) und (b) Decoy-ODN (IRF-1n cons, 10 μ M, 5 Stunden Vorinkubation) gegen IRF-1 auf den Reichtum an CD40 mRNA in humanen Endothelzellen, die für 9 Stunden mit TNF α (100 U/ml)/IFN γ (1000 U/ml) inkubiert wurden. Als unspezifische Kontrolloligonukleotide wurden die Antisense-Oligonukleotide IRF-1MS und IRF-1SCR und das IRF-1n mit Decoy-ODN verwendet. Repräsentative Versuche, vergleichbare Ergebnisse wurden für die Antisense-Technik in weiteren Experimenten erhalten.

[0015] Der hier verwendete Ausdruck "Decoy-ODN" oder "Cis-Element Decoy" oder "doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid" bezeichnet ein doppelsträngiges DNA-Molekül, das eine Sequenz aufweist, die der natürlichen IRF-1 Kernbindungssequenz im Genom entspricht oder ähnelt und an die der Transkriptionsfaktor IRF-1 in der Zelle bindet. Das Cis-Element Decoy wirkt somit als Molekül zur kompetitiven Inhibierung von IRF-1.

[0016] Die Erfinder konnten die bei der entzündungsbedingten, Zytokin-vermittelten Steigerung der CD40-Rezeptorexpression in humanen Endothelzellen beteiligten Transkriptionsfaktoren aufklären. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass die Transkriptionsfaktoren Nuclear Factor κ B (NF- κ B) und Signal Transducer and Activator of Transcription-1 (Stat-1) die Tumornekrosefaktor- α /Interferon- γ -medierte CD40-Expression nicht, wie in glatten Gefäßmuskelzellen von Nagetieren der Fall, direkt, sondern indirekt durch Aktivierung eines weiteren Transkriptionsfaktors, dem Interferon-Regulator Factor-1 (IRF-1), steuern. IRF-1 (GenBank Acc.No.: L05078, X14454, NM002198 und <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/qt/getEntry.pl?i00423>) ist ein Transkriptionsfaktor, der im Gegensatz zu vielen anderen Transkriptionsfaktoren in der Zelle nicht latent vorhanden ist, sondern erst de novo synthetisiert werden muss und zwar im Regelfall nach Exposition gegenüber Interferon- γ und Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat-1.

[0017] Des weiteren stimuliert Interferon- γ alleine oder in Kombination mit Tumornekrosefaktor- α in humanen Endothelzellen die Expression von CD40; hierbei spielt die TNF α -abhängige Aktivierung von NF- κ B eine untergeordnete Rolle. Wichtiger ist die IFN- γ -abhängige Aktivierung von Stat-1 infolgedessen es zur de novo-Expression von IRF-1 kommt. IRF-1 induziert dann die Expression von CD40. Der Synergismus der beiden Zytokine beruht im Wesentlichen auf einer Verstärkung der IRF-1-Expression. Werden die erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotide gegen Stat-1 und IRF-1, nicht aber entsprechende Kontroll-Decoy-Oligonukleotide in humanen Zellen in Zellkultur verwendet, wird die Zytokin-induzierte CD40-Expression (sowohl bei Monostimulation mit IFN γ wie auch bei Kombination von IFN γ und TNF α) gehemmt. Dabei geht die Induktion von IRF-1 der Induktion von CD40 voraus, so dass eine Antisense-Oligonukleotid-Blockade der IRF-1-Expression die Zytokin-induzierte CD40-Expression in demselben Umfang wie die Decoy-Oligonukleotide hemmt. Ein Ausschalten der IRF-1-Aktivität in Zellen hat eine hochsignifikante und selektive Inhibierung der CD40-Expression in diesen Zellen zur Folge. Infolge der verminderten CD40-Expression unter proinflammatorischen Bedingungen wird die Endothel-Leukozyten-Wechselwirkung, insbesondere die Interaktion von TH1- und Endothelzellen abgeschwächt und stellt die Grundlage für den Therapieerfolg dar. Sinngemäß gilt dies auch für die Abschwächung der CD40/CD154-vermittelten Interaktion von naiven T-Helferzellen mit Antigen-präsentierenden Zellen (z. B. Monozyten, dendritische Zellen), von TH2-Zellen mit B-Lymphozyten, sowie von anderen CD40-exprimierenden Zellen (z. B. glatte Muskelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten) mit CD154-exprimierenden Zellen (TH1-Zellen, aktivierte Thrombozyten).

[0018] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht daher in der Bereitstellung eines Inhibitors der Aktivität des Transkriptionsfaktors IRF-1 als therapeutisches Mittel. Proteine, wozu auch IRF-1 zählt, können auf verschiedenste

Weise in ihrer Aktivität inhibiert werden. So können z. B. Anti-IRF-1-Antikörper, natürliche oder synthetische Substanzen, die die IRF-1-Interaktion mit der DNA, d. h. die Transaktivierungsaktivität mindern, verwendet werden. Ferner könnte man die de novo-Synthese von IRF-1 durch Blockade von Stat-1 bzw. der zur Stat-1-Aktivierung führenden Signalwege (Janus-Kinasen) inhibieren.

5 **[0019]** Ein bevorzugtes Verfahren zur spezifischen Inhibierung der IRF-1-Aktivität ist die Verwendung von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden, auch Cis-Element Decoy oder Decoy-ODN genannt, die eine Bindungsstelle für IRF-1 enthalten. Die exogene Zufuhr einer großen Zahl von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen zu einer Zelle, insbesondere in viel höherer Zahl als im Genom vorhanden, erzeugt eine Situation, in der die Mehrzahl eines bestimmten Transkriptionsfaktors spezifisch an das jeweilige Cis-Element Decoy und nicht an seine endogenen Ziel-Bindungsstellen bindet. Dieser Ansatz zur Inhibition der Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre endogene Bindungsstelle wird auch als Squelching bezeichnet. Squelching von Transkription unter Verwendung von Cis-Element Decoys wurde erfolgreich eingesetzt, um das Wachstum von Zellen zu inhibieren. Dabei wurden DNA-Fragmente verwendet, die spezifische Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors E2F enthielten (Morishita et al., PNAS, (1995) 92, 5855).

10 **[0020]** Die Sequenz einer Nukleinsäure, die zur Verhinderung der Bindung des Transkriptionsfaktors IRF-1 verwendet wird, ist beispielsweise die Sequenz, an die IRF-1 natürlicherweise in der Zelle bindet. IRF-1 bindet spezifisch an das Motiv mit der Sequenz 5'-SAAAGYGAAACC-3', wobei S = C oder G und Y = C oder T bedeutet. Für eine Bindung von IRF-1 kommt es auf die sich wiederholenden G/CAAA-Sequenzen und den Abstand zwischen diesen Motiven an, der insbesondere drei Nukleotide beträgt. Daher kann das erfindungsgemäße Cis-Element Decoy folgende 13-mer Konsensus-Kernbindungssequenz aufweisen: 5'-SAAAnnnSAAayy-3' (SEQ ID.NO: 1), wobei S = C oder G, n = A, T, C oder G und y = C oder T bedeutet. Das Cis-Element Decoy kann ferner größer als die 13-mer Kernbindungssequenz sein und am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende verlängert werden.

20 **[0021]** Da das Cis-Element Decoy eine doppelsträngige Nukleinsäure ist, umfaßt das erfindungsgemäße DNA-Oligonukleotid jeweils nicht nur die Sense- oder Forward-Sequenz sondern auch die komplementäre Antisense- oder Reverse-Sequenz. Bevorzugte erfindungsgemäße DNA-Oligonukleotide weisen folgende 13-mer-Kernbindungssequenzen für IRF-1 auf:

5'-CAAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO: 3),
5'-GAAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO: 5),
5'-CAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO: 7),
5'-GAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO: 9),

30 wobei die jeweiligen komplementären Sequenzen hier nicht wiedergeben sind. Das Cis-Element Decoy kann jedoch auch eine zur vorstehenden Sequenz abweichende Sequenz aufweisen und länger als ein 13-mer sein.

[0022] Besonders bevorzugt sind folgende Sequenzen:

(SEQ ID NO: 11): 5'-CAGAAAAGTGAAACCC¹TG-3', 18-mer (nicht palindromisch, 1 Bindungsstelle),
(SEQ ID NO: 13): 5'-CAGTTTCAAATTGAAACTG-3', 19-mer (nahezu palindromisch, 2 Bindungsstellen),
35 (SEQ ID NO: 15): 5'-CAGGAAAAGTGAAACCGCTG-3', 20-mer (nicht palindromisch, 1 Bindungsstelle),
(SEQ ID NO: 17): 5'-GCAGTTTCAAATTGAAACTGC-3', 21-mer (nahezu palindromisch, 2 Bindungsstellen),
(SEQ ID NO: 19): 5'-GGAAGCGAAAATGAAATTGACT-3', 22-mer (primär benutzte Konsensus-Sequenz),
(SEQ ID NO: 21): 5'-GGCAGTTTCAAATTGAAACTGCC-3', 23-mer (nahezu palindromisch, 2 Bindungsstellen).

40 **[0023]** Die Bemerkung "2 Bindungsstellen" bezieht sich dabei auf Sense- und Antisense-Strang. Diese Aufzählung der bevorzugten Sequenzen ist nicht abschließend. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass eine Vielzahl von Sequenzen als Inhibitor für IRF-1 verwendet werden können, solange sie die vorstehend aufgeführten Bedingungen der 13-mer Konsensus-Kernbindungssequenz und eine Affinität zu IRF-1 aufweisen.

45 **[0024]** Die Affinität der Bindung einer Nukleinsäuresequenz an IRF-1 kann durch die Verwendung des Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191) bestimmt werden. Dieses Testsystem ist für die Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren, die für die Verwendung in der Methode der gegenwärtigen Erfindung gedacht sind, oder die Bestimmungen der optimalen Länge einer Bindungsstelle geeignet. Sie ist auch für die Identifizierung von anderen Sequenzen, die durch IRF-1 gebunden werden, geeignet. Für einen EMSA, gedacht für die Isolation neuer Bindungsstellen, sind am besten gereinigte oder rekombinant exprimierte Versionen von IRF-1 geeignet, die in mehreren abwechselnden Runden von PCR-Vervielfältigung und Selektion durch EMSA eingesetzt werden (Thiesen und Bach (1990) Nucleic Acids Res. 18, 3203).

50 **[0025]** Gene, von denen bekannt ist, dass sie IRF-1-Bindungsstellen in ihrem Promotor oder Enhancer-Regionen enthalten, und die deshalb mutmaßliche Ziele für das spezifische Squelchen durch die Methode der gegenwärtigen Erfindung sind, sind beispielsweise das CD40-Gen und weitere proinflammatorische Gene z. B. Cyclooxygenase-2, Untereinheiten der NADPH-Oxidase (p67phox und gp91phox), die induzierbare Isoform der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase, die Interleukine 6, 8 und 12 sowie die Adhäsionsmoleküle RANTES (löslich von T-Lymphozyten sezerniert, regulated upon activation, normal T-cell expressed, presumed secreted) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, auch CD106 genannt).

60 **[0026]** Die Methode der vorliegenden Erfindung moduliert die Transkription eines Gens oder von Genen in einer solchen Weise, dass das Gen oder die Gene, z. B. CD40, nicht oder vermindert exprimiert werden. Verminderte oder unterdrückte Expression im Rahmen der gegenwärtigen Erfindung bedeutet, dass die Transkriptionsrate verringert ist im Vergleich zu Zellen, die nicht mit einem erfindungsgemäßen doppelsträngigen DNA-Oligonukleotid behandelt werden. Solch eine Verminderung kann beispielsweise durch Northern Blot (Sambrook et al., 1989) oder RT-PCR (Sambrook et al., 1989) bestimmt werden. Typischerweise ist eine solche Verringerung zumindest eine 2-fache, besonders zumindest eine 5-fache, insbesondere zumindest eine 10-fache Verringerung. Der Verlust von Aktivierung kann beispielsweise erreicht werden, wenn IRF-1 an einem bestimmten Gen als Transkriptionsaktivator wirkt und deshalb Squelching des Aktivators zum Verlust der Expression des Zielgens führt.

65 **[0027]** Das Cis-Element Decoy, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, enthält in einer bevorzugten Ausführungsform eine oder mehrere, vorzugsweise 1, 2, 3, 4 oder 5, insbesondere bevorzugt 1 oder 2 Bindungsstellen, an die

IRF-1 spezifisch bindet. Die Nukleinsäuren können synthetisch, mit enzymatischen Methoden oder in Zellen hergestellt werden. Die einzelnen Verfahren sind Stand der Technik und dem Fachmann bekannt.

[0028] Die Länge des doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids ist mindestens so lang wie eine verwendete Sequenz, die spezifisch IRF-1 bindet. Üblicherweise ist das verwendete doppelsträngige DNA-Oligonukleotid zwischen etwa 13–65 bp, vorzugsweise zwischen etwa 13–26 bp und besonders bevorzugt zwischen 18–23 bp gewählt.

[0029] Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- und Exonukleasen, im besonderen DNasen und RNasen in der Zelle, abgebaut. Deshalb können die DNA-Oligonukleotide modifiziert werden, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so dass über einen längeren Zeitraum eine hohe Konzentration der Oligonukleotide in der Zelle beibehalten wird. Typischerweise kann eine solche Stabilisierung durch die Einführung von einer oder mehrerer modifizierter Internukleotidbindungen erhalten werden.

[0030] Ein erfolgreich stabilisiertes DNA-Oligonukleotid enthält nicht notwendigerweise eine Modifikation an jeder Internukleotidbindung. Vorzugsweise sind die Internukleotidbindungen an den jeweiligen Enden beider Oligonukleotide des Cis-Element Decoys modifiziert. Dabei können die letzten sechs, fünf, vier, drei, zwei oder die letzte oder eine oder mehrere Internukleotidbindungen innerhalb der letzten sechs Internukleotidbindungen modifiziert sein. Ferner können verschiedene Modifikationen der Internukleotidbindungen in die Nukleinsäure eingeführt werden und die daraus entstehenden doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide auf sequenzspezifische Bindung an IRF-1, unter Verwendung des Routine EMSA-Testsystems, getestet werden. Dieses Testsystem erlaubt die Bestimmung der Bindungskonstante des Cis-Element Decoys und so die Bestimmung, ob die Affinität durch die Modifikation verändert wurde. Modifizierte Cis-Element Decoys, die noch eine ausreichende Bindung zeigen, können ausgewählt werden, wobei eine ausreichende Bindung zumindest etwa 50% oder zumindest etwa 75%, und besonders bevorzugt etwa 100% der Bindung der unmodifizierten Nukleinsäure bedeutet.

[0031] Cis-Element Decoys mit modifizierter Internukleotidbindung, die immer noch ausreichende Bindung zeigen, können überprüft werden, ob sie stabiler in der Zelle sind als die unmodifizierten Cis-Element Decoys. Die mit den erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys transfizierten Zellen werden zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Menge der dann noch vorhandenen Cis-Element Decoys untersucht. Dabei können die dem Fachmann bekannten Verfahren verwendet werden, z. B. Southern Blot- (Sambrook et al. (1989) supra), PCR- (Sambrook et al. (1989) supra) oder DNA Chip Array- (US 5,837,466) Techniken. Ein erfolgreich modifiziertes Cis-Element Decoy hat eine Halbwertszeit in der Zelle, die höher ist als die eines unmodifizierten Cis-Element Decoy, vorzugsweise von zumindest etwa 48 Stunden, mehr bevorzugt von zumindest etwa 4 Tagen, am meisten bevorzugt von mindestens etwa 7 Tagen.

[0032] Geeignete modifizierte Internukleotidbindungen sind in Uhlmann und Peyman ((1990) Chem. Rev. 90, 544) zusammengefasst. Modifizierte Internukleotid-Phosphat-Reste und/oder Nicht-Phosphor-Brücken in einer Nukleinsäure, die in einer Methode der gegenwärtigen Erfindung eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphorodithioat, Phosphoramidat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoge, beispielsweise Siloxan-Brücken, Carbonat-Brücken, Carboxymethylester-Brücken, Acetamidat-Brücken und/oder Thioether-Brücken enthalten.

[0033] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Stabilisierung von Nukleinsäuren durch die Einführung struktureller Merkmale in die Nukleinsäure, die die Halbwertszeit der Nukleinsäure erhöhen. Solche Strukturen, die Haarnadel- und Glocken-DNA enthalten, sind in US 5,683,985 offenbart. Gleichzeitig können modifizierte Internukleotid-Phosphat-Reste und/oder Nicht-Phosphor-Brücken, zusammen mit den genannten Strukturen, eingeführt werden. Die sich daraus ergebenden Nukleinsäuren können im oben beschriebenen Testsystem auf Bindung und Stabilität geprüft werden.

[0034] Die Kernbindungssequenz kann nicht nur in einem Cis-Element Decoy vorliegen, sondern auch in einem Vektor. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor ein Plasmidvektor und im besonderen ein Plasmidvektor, der in der Lage ist, autosomal zu replizieren, wodurch er die Stabilität der eingeführten doppelsträngigen Nukleinsäure erhöht.

[0035] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid, das in der Lage ist, sequenzspezifisch an den Transkriptionsfaktor IRF-1 zu binden und vorzugsweise eine der folgenden Sequenzen hat, wobei hier nur jeweils ein Strang des doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids wiedergegeben ist und der komplementäre Strang ebenfalls umfaßt ist:

5'-SAAAnnnSAAAYy-3' (SEQ ID NO: 1),
 5'-CAAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO: 3),
 5'-GAAAAGCGAAACC-3' (SEQ ID NO: 5),
 5'-CAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO: 7),
 5'-GAAAAGTGAAACC-3' (SEQ ID NO: 9),
 5'-CAGAAAAGTGAAACCCTG-3' (SEQ ID NO: 11),
 5'-CAGTTTCAAATTGAAACTG-3' (SEQ ID NO: 13),
 5'-CAGGAAAAGTGAAACCGCTG-3' (SEQ ID NO: 15),
 5'-GCAGTTTCAAATTGAAACTGC-3' (SEQ ID NO: 17),
 5'-GGAAGCGAAAATGAAATTGACT-3' (SEQ ID NO: 19),
 5'-GGCAGTTTCAAATTGAAACTGCC-3' (SEQ ID NO: 21).

[0036] Doppelsträngige DNA-Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung haben eine Länge, Modifikationen und eventuell eine Wiederholung der spezifischen Bindungsstelle, wie im Einzelnen vorstehend beschrieben. Die optimale Länge des Cis-Element Decoys ist ausgewählt, um die Bindung an IRF-1 und die Aufnahme in die Zelle zu optimieren. Typischerweise bindet ein doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid, das kürzer als 12 bp ist, nur schwach an sein Zielprotein, während ein doppelsträngiges DNA-Oligonukleotid, das länger als 22 bp ist, obwohl es stark bindet, nur mit einer niedrigen Effizienz in die Zelle aufgenommen wird. Die Bindungsstärke kann durch EMSA bestimmt werden, während die Aufnahme der doppelsträngigen Nukleinsäure durch Southern Blot- (Sambrook et al. (1989) supra), PCR- (Sambrook et al. (1989) supra), DNA-Chip-Array-Technologien (US 5, 837, 466) oder mittels fluoreszenzmarkierten Cis-Element Decoys und digitaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden kann. Ein Cis-Element Decoy der gegenwärtigen Erfin-

dung kann wie oben beschrieben stabilisiert werden.

[0037] Eine bevorzugte Ausführungsform der gegenwärtigen Erfindung sind Cis-Element Decoys, die eine palindromische Bindungsstelle enthalten und daher in einer kurzen doppelsträngigen Nukleinsäure zumindest zwei Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen umfassen. Die palindromische Sequenz hat nicht notwendigerweise eine höhere Bindung von IRF-1 zur Folge, sondern wird schneller (effizienter) von den Zielzellen aufgenommen. Allerdings sind vor allem die kürzeren erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys wegen der langen (mittig angeordneten) Kernbindungssequenz und den repetitiven G/CAA-Motiven nur an den Enden palindromisch. Für eine effizientere Aufnahme kann eine möglichst ähnliche Anzahl der einzelnen Basen ($A = C = G = T$) verwendet werden, jedoch ist dies für die erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys aufgrund der repetitiven G/CAA-Motive schwierig. Bevorzugt wird daher ein Kompromiss, wobei zumindest $A = T$ und $C = G$ sein soll. Ferner bevorzugt kann die Kernbindungssequenz eher randständig angeordnet sein, wie dies bei einigen der bevorzugten Cis-Element Decoy-Sequenzen der Fall ist.

[0038] Ein Cis-Element Decoy der vorliegenden Erfindung wird schnell in die Zelle aufgenommen. Eine ausreichende Aufnahme ist durch die Modulation von einem oder mehreren Genen, das durch IRF-1 moduliert werden kann, charakterisiert. Das Cis-Element Decoy der vorliegenden Erfindung moduliert in bevorzugter Weise die Transkription von einem Gen oder Genen nach etwa 2 Stunden der Berührung mit der Zelle, mehr bevorzugt nach etwa 1 Stunde, nach etwa 30 Min., nach etwa 10 Min. und am meisten bevorzugt nach etwa 2 Min. Eine typische Mischung, die in so einem Versuch eingesetzt wird, enthält 10 $\mu\text{mol/l}$ Cis-Element Decoy.

[0039] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Modulation der Transkription von mindestens einem Gen CD40-exprimierenden Zellen, insbesondere in Endothelzellen, Monozyten, dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, glatten Muskelzellen, Keratinozyten oder Fibroblasten, wobei die Methode den Schritt der Kontaktierung der genannten Zellen mit einer Mischung, enthaltend eine oder mehrere doppelsträngige Nukleinsäure(n), die in der Lage sind, sequenzspezifisch an den Transkriptionsfaktor IRF-1 zu binden, umfaßt. Ein bevorzugtes Verfahren ist die Anwendung in Endothelzellen, die Teil eines Transplantates sind. Typischerweise wird die Methode an einem Transplantat in vivo oder ex vivo vor der Implantation angewendet.

[0040] Die Transplantate können vor der Implantation durch ex vivo Anwendung der Methode der gegenwärtigen Erfindung oder nach der Implantation durch in vivo Anwendung der Methode behandelt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das behandelte Transplantat (Dünn-) Darm, Herz, Leber, Lunge, Niere und Pankreas bzw. eine Kombination mehrerer Organe. Die Behandlung der Organe, genauer die Perfusion/Inkubation ihrer Blutgefäße mit den erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys kann ex vivo mit Ausspülen der Lösung unmittelbar vor der Implantation erfolgen. Dabei kann das Organ gleichzeitig in einer entsprechenden Konservierungslösung (gekühlt) in der Weise gelagert werden (z. B. University of Wisconsin Solution, Brettschneider HTK-Lösung), dass keine Konservierungslösung in die Blutgefäße während der Inkubation mit der Decoy-Oligonukleotid-Lösung eindringen kann.

[0041] Die Mischung enthaltend die erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys wird mit den Zielzellen (z. B. Endothelzellen, Monozyten, dendritische Zellen, B-Lymphozyten, glatte Muskelzellen, Keratinozyten oder Fibroblasten) in Berührung gebracht. Das Ziel dieses In-Berührung-Bringens ist die Übertragung der Cis-Element Decoys, die IRF-1 binden, in die Zielzelle (d. h., die CD40-exprimierende Zelle). Deshalb können Nukleinsäure-Modifikation und/oder Zusatzstoffe oder Hilfsstoffe, von denen bekannt ist, dass sie die Durchdringung von Membran erhöhen, im Rahmen der gegenwärtigen Erfindung benutzt werden (Uhlmann und Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 544).

[0042] Eine Mischung gemäß der Erfindung enthält in einer bevorzugten Ausführungsform im wesentlichen nur Nukleinsäure und Puffer. Eine geeignete Konzentration der Cis-Element Decoys liegt im Bereich von zumindest 0,1 bis 100 $\mu\text{mol/L}$, vorzugsweise bei 10 $\mu\text{mol/L}$, wobei ein oder mehrere geeignete Puffer zugesetzt werden. Ein Beispiel eines solchen Puffers ist Tyrode-Lösung enthaltend 144,3 mmol/l Na^+ , 4,0 mmol/l K^+ , 138,6 mmol/l Cl^- , 1,7 mmol/l Ca^{2+} , 1,0 mmol/l Mg^{2+} , 0,4 mmol/l HPO_4^{2-} , 19,9 mmol/l HCO_3^- , 10,0 mmol/l D-Glucose.

[0043] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält die Mischung zusätzlich mindestens einen Zusatzstoff und/oder Hilfsstoff. Zusatzstoffe und/oder Hilfsstoffe wie Lipid, kationische Lipide, Polymere, Liposomen, Nukleinsäure-Aptamere, Peptide und Proteine, die an DNA gebunden sind, oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle sind beabsichtigt, um beispielsweise die Einbringung von Nukleinsäuren in die Zelle zu erhöhen, um die Mischung auf nur eine Untergruppe von Zellen zu richten, um den Abbau der Nukleinsäure in der Zelle zu verhindern, um die Lagerung der Nukleinsäuremischung vor der Verwendung zu erleichtern. Beispiele für Peptide und Proteine oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle sind z. B. Antikörper, Antikörperfragmente, Liganden, Adhäsionsmoleküle, die alle modifiziert oder unmodifiziert sein können.

[0044] Zusatzstoffe, die die Cis-Element Decoys in der Zelle stabilisieren, sind beispielsweise Nukleinsäure-kondensierende Substanzen wie kationische Polymere, Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin.

[0045] Die Mischung, die in dem Verfahren der gegenwärtigen Erfindung eingesetzt wird, wird bevorzugt lokal angewendet durch Injektion, Katheter, Suppositorium ("Zäpfchen"), Aerosole (Nasen- bzw. Mundspray, Inhalation) Trokars, Projektile, pluronische Gele, Polymere, die anhaltend Medikamente freisetzen, oder jede andere Vorrichtung, die lokalen Zugang ermöglicht. Auch die ex vivo Anwendung der Mischung, verwendet im Verfahren der gegenwärtigen Erfindung, erlaubt einen lokalen Zugang.

[0046] Die Inhibierung der IRF-1-Aktivität kann jedoch nicht nur auf Proteinebene in den zuvor beschriebenen Verfahren gehemmt werden, sondern kann bereits vor oder bei der Translation bewirkt werden. Daher ist ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung die Bereitstellung eines Inhibitors der IRF-1-Expression als therapeutisches Mittel. Dieser Inhibitor ist vorzugsweise ein einzelsträngiges Nukleinsäure-Molekül, ein sogenanntes Antisense-Oligonukleotid. Antisense-Oligonukleotide können die Synthese eines Zielgens auf drei verschiedenen Ebenen hemmen, bei der Transkription (Verhinderung der hnRNA-Synthese), der Prozessierung (Spleißen) der hnRNA zur mRNA und der Translation der mRNA in Protein an den Ribosomen. Das Verfahren zur Inhibierung der Expression von Genen mittels Antisense-Oligonukleotiden ist Stand der Technik und den Fachleuten bestens bekannt. Vorzugsweise hat das im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Antisense-Oligonukleotid gegen IRF-1 die Sequenz 5'-CGAGTGAATGGGCATGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 23) und überbrückt das Startcodon. Weitere bevorzugte Sequenzen für Antisense-Oligonukleotide sind 5'-

GATTCGGCTGGTCGC-3' (SEQ ID NO: 24), 5'-TAATCCAGATGAGCCC-3' (SEQ ID NO: 25) und 5'-GGAGCGATTCCGGCTGGT-3' (SEQ ID NO: 26). Das Antisense-Oligonukleotid kann ein einzelsträngiges DNA-Molekül, RNA-Molekül oder ein DNA/RNA-Hybrid-Molekül sein. Das Antisense-Oligonukleotid kann ferner eine oder mehrere modifizierte Internukleotidbindungen aufweisen, z. B. die vorstehend für das Cis Element Decoy beschriebenen.

[0047] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Antisense-Oligonukleotid, das spezifisch die IRF-1-Expression inhibiert und vorzugsweise eine der folgenden Sequenzen hat:

5'-CGAGTGATGGGCATGTTGGC-3' (SEQ ID NO: 23),

5'-GATTCCGGCTGGTCGC-3' (SEQ ID NO: 24),

5'-TAATCCAGATGAGCCC-3' (SEQ ID NO: 25),

5'-GGAGCGATTCCGGCTGGT-3' (SEQ ID NO: 26).

[0048] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Antisense-Oligonukleotide und/oder doppelsträngigen DNA-Moleküle zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention und/oder Therapie von chronischen (Transplantat-Arteriosklerose oder Vaskulopathie) oder akuten Transplantatabstoßungen, chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen, insbesondere Asthma bronchiale, atopische Dermatitis, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Psoriasis und Sarkoidose, sowie Autoimmunerkrankungen, insbesondere Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Kollagenosen (z. B. systemischer Lupus erythematoses), rheumatoide Arthritis und Vaskulitiden. Ein besonderer Vorteil dieses Therapieansatzes besteht des weiteren in der gleichzeitigen Abschwächung der TH1- und TH2-Zellantwort, bei denen der CD40/CD154-Signalweg kostimulatorisch wirkt. Dadurch kann es nicht zu einer Enthemmung der TH1-Zellreaktion (z. B. multiple Sklerose) bei Dämpfung der TH2-Zellreaktion (z. B. Asthma bronchiale) bzw. umgekehrt kommen.

[0049] Die folgenden Figuren und Beispiele dienen nur der Erläuterung und beschränken in keiner Weise den Umfang der Erfindung.

1. Zellkultur

[0050] Humane Endothelzellen wurden durch Behandlung mit 1,6 U/ml Dispase in HEPES-modifizierter Tyrodelösung für 30 Min. bei 37°C aus Nabelschnurvenen isoliert und auf Gelatinebeschichteten 6-Loch-Gewebekulturschalen (2 mg/ml Gelatine in 0,1 M HCl für 30 Min. bei Umgebungstemperatur) in 1,5 ml M199 Medium, enthaltend 20% fötales Kälberserum, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 10 U/ml Nystatin, 5 mM HEPES und 5 mM TES, 1 µg/ml Heparin und 40 µg/ml endothelialer Wachstumsfaktor, kultiviert. Sie wurden durch ihre typische Pflasterstein-Morphologie, positive Immunfärbung für von Willebrandt-Faktor (vWF) und fluorimetrischen Nachweis (FACS) von PECAM-1 (CD31) sowie negative Immunfärbung für glattes Muskel α -Actin (Krzysz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191) identifiziert.

2. RT-PCR-Analyse

[0051] Die endotheliale gesamt-RNA wurde mit dem Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert, daran anschließend wurde eine cDNA-Synthese mit einem Maximum von 3 µg RNA und 200 U Superscript™ II Reversetranskriptase (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 20 µl entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Für den Abgleich der cDNA-Beladung wurden 5 µl (ungefähr 75 ng cDNA) der resultierenden cDNA-Lösung und dem Primerpaar (Gibco) für Elongationsfaktor 1 (EF-1) PCR mit 1 U Taq DNA Polymerase (Gibco) in einem Gesamtvolumen von 50 µl benutzt. EF-1 diente als interner Standard für die PCR. Die PCR-Produkte wurden auf 1,5% Agarose-Gelen enthaltend 0,1% Ethidiumbromid separiert und die Intensität der Banden wurde densitometrisch mit einem CCD-Kamerasystem und der One-Scan Gelanalyse-Software von Scanalytics (Billerica, MA, USA) bestimmt, um in nachfolgenden PCR-Analysen das Volumen der cDNA anzupassen.

[0052] Alle PCR-Reaktionen wurden einzeln für jedes Primer-Paar in einem Hybaid Omne Thermocycler (AWG; Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die einzelnen PCR-Bedingungen für die cDNA von humanen Nabelschnurendothelzellen waren wie folgt: CD40 (Produktgröße 381 bp, 25 Zyklen, Anlagerungstemperatur 60°C, (Vorwärtsprimer) 5'-CAG AGT TCA CTG AAA CGG AAT GCC-3', (umgekehrter Primer) 5'-TGC CTG CCT GTT GCA CAA CC-3'); E-Selectin (Produktgröße 304 bp, 33 Zyklen, Anlagerungstemperatur 60°C, (Vorwärtsprimer) 5'-AGC AAG GCA TGA TGT TAA CC-3', (umgekehrter Primer) 5'-GCA TTC CTC TCT TCC AGA GC-3'); IRF-1 (Produktgröße 310 bp, 29 Zyklen, Anlagerungstemperatur 55°C, (Vorwärtsprimer) 5'-TTC CCT CTT CCA CTC GGA GT-3', (umgekehrter Primer) 5'-GAT ATC TGG CAG GGA GTT CA-3'); EF-1 (Produktgröße 220 bp, 22 Zyklen, Anlagerungstemperatur 55°C, (Vorwärtsprimer) 5'-TCT TAA TCA GTG GTG GAA G-3', (umgekehrter Primer) 5'-TTT GGT CAA GTT GTT TCC-3').

3. Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Analyse (EMSA)

[0053] Die nukleären Extrakte und [32P]-markierten doppelsträngigen Konsensus-Oligonukleotide (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland), nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Autoradiographie und Supershift-Analyse wurden wie bei Krzysz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191 beschrieben durchgeführt. Oligonukleotide mit der folgenden einzelsträngigen Sequenz wurden verwendet (Kernbindungssequenzen sind unterstrichen): NF- κ B, 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'; STAT-1, 5'-CAT GTT ATG CAT ATT CCT GTA AGT G-3'; IRF-1, 5'-GGA AGC GAA AAT GAA ATT GAC T-3'.

4. Decoy-Oligodesoxynukleotid (dODN) Technik

[0054] Doppelsträngige dODN wurden von den komplementären einzelsträngigen Phosphorothioatverbundenen Oligodesoxynukleotiden (Eurogentec, Köln, Deutschland) wie bei Krzysz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191 beschrieben

hergestellt. Die kultivierten humanen Endothelzellen wurden für 4 Stunden bei einer Konzentration von 10 µM des jeweiligen dODN vorinkubiert. Dies waren die Bedingungen, die bereits vorher aufgrund von EMSA und RT-PCR-Analyse optimiert wurden. Danach wurde das dODN-enhaltende Medium durch frisches Medium ersetzt. Die einzelsträngigen Sequenzen der dODN waren wie folgt (unterstrichene Buchstaben kennzeichnen Phosphorothioat-verbundene Basen, alle in 5'-3' Richtung):

- 5 NF-κB, AGTTGAGGGGACTTTCCC AGGC;
 STAT-1, CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG;
 IRF-1, GGAAGCGAAAAATGAAATTGACT;
 IRF-1n cons CAGAAAAGTGAAACCCTG;
 10 IRF-1n mut CAGATGAGTGTAACCCTG.

5. Antisense-Oligonukleotid-Technik

- [0055] Für einen Antisense-Ansatz wurde 1 ml Kulturmedium mit 3% Lipofectin (v/v) (Gibco Life Technologie, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und für 30 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Im Anschluss daran wurde das entsprechende Antisense-Oligonukleotid (Eurogentec, Köln, Deutschland) in einer finalen Konzentration von 0,2 µM hinzugegeben und weitere 15 Min. bei RT inkubiert. Bei Versuchsbeginn wurden die entsprechenden Mengen Heparin und endothelialer Wachstumsfaktor hinzugefügt und das herkömmliche Zellkulturmedium der Endothelzellkultur durch das Antisense-Lipofectin-Medium ersetzt. Nach 5 Stunden wurde das Antisense-Lipofectin-Medium entfernt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Sequenz des IRF-1-Antisense-Oligonukleotid (IRF-1 AS) war 5'-CGAGTGATGGGCATGTTGGC-3'. Als Kontrollen wurden ein Missense-Oligonukleotid (IRF-1 MS, 5'-CGAGTGGTAGACGTATTTGGC-3') und ein Scrambled-Oligonukleotid (IRF-1 SCR, 5'-GAGCTGCTGAGGTCGTTGAG-3') verwendet.

6. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

- [0056] Die zu analysierenden Endothelzellen wurden zunächst dreimal mit je 1 ml FACS-Puffer (PBS, 2% fötales Kälberserum, sterilfiltriert) gewaschen und anschließend in 2 ml FACS-Puffer aufgenommen. Nach Zentrifugation (300xg, 5 Min., +4°C) und Bestimmung der Gesamtzellzahl (Neubauer-Zählkammer) wurde der fluoreszenz-markierte Antikörper (Pharmingen, San Diego, USA) nach Angaben des Herstellers (20 µl/10⁶ Zellen) hinzugegeben und der Ansatz für 30 Min. bei +4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und für 10 Min. bei 300xg und +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 1 ml Cell-Fix (PBS, 1% Formaldehyd) resuspendiert und bis zur Messung (EPICS[®]XL-MCL, Coulter, Krefeld, Deutschland) bei +4°C im Dunkeln gelagert. Folgende Antikörper wurden verwendet: CD40, R-Phycoerythrin (R-PE)- und Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-konjugiert; PECAM-1 (CD31), Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-konjugiert. Zur Feststellung unspezifischer Zell-Antikörper-Bindungen wurden die entsprechenden R-PE- und FITC-konjugierten Isotyp-Kontrollen eingesetzt.

7. Western Blot-Analyse

- [0057] Die Endothelzellen wurden durch fünfmaliges aufeinanderfolgendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C (Heizblock, Kleinfeld) aufgeschlossen. Protein-Extrakte wurden wie bei Hecker et al. (1994) Biochem J. 299, 247 beschrieben hergestellt. 20–30 µg Protein wurden mit Hilfe einer 10%igen Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in der Gegenwart von SDS nach Standardprotokoll aufgetrennt und auf eine BioTrace[™] Polyvinylidene Fluoride Transfermembran (Pall Corporation, Roßdorf, Deutschland) transferiert. Zum Nachweis von CD40 Protein wurde ein gegen den C-Terminus gerichteter polyklonaler primärer Antikörper (Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ, USA) verwendet. Die Proteinbanden wurden nach Hinzufügen eines Peroxidase-gekoppelter-Anti-Kaninchen-IgG (1 : 3000, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), durch die Chemilumineszenz-Methode (SuperSignal Chemiluminescent Substrate; Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) verbunden mit nachfolgender Autoradiographie (Hyperfilm[™] MP, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) nachgewiesen. Der Auftrag und Transfer gleicher Proteinmengen wurde durch Färben des Blots mit blauer Tinte gezeigt.

8. Statistische Analyse

- [0058] Wenn nicht anders angezeigt, sind alle Daten in Figuren und Text als Mittelwert ± SEM von n Experimenten angegeben. Die statistische Auswertung wurde mit dem Students t-Test für ungepaarte Daten mit einem P-Wert < 0,05, der als statistisch signifikant angesehen wurde, durchgeführt.

9. Tierexperimenteller Nachweis der CD40/CD154-assoziierten Transplantatabstoßung

- [0059] Experimentell nachgewiesen wurde die Transplantatabstoßung in der Ratte unter Verwendung eines Stat-1-Decoy-Oligonukleotides, da bei der Ratte Stat-1 anstelle von IRF-1 wie beim Menschen für die Interferon-γ-induzierte CD40-Expression verantwortlich ist.

Stammkombination

- [0060] Zur allogenen Transplantation wird die Stammkombination Brown Norway-Spender auf Lewis-Empfänger verwendet. Hierbei kommt es ohne Immunsuppression nach 7 Tagen zur Abstoßung des Transplantates. Als syngene Kontrollen dient die Transplantation Lewis auf Lewis.

Explantation

[0061] In Etherinhalationsnarkose wird das Abdomen des Tieres in der Mittellinie eröffnet. Zunächst wird ein Aortasegment von allen arteriellen Abgängen befreit, so dass ein ca. 1 cm langes aortales Segment mit angehefter Arteria mesenterica präpariert wird. Im nächsten Schritt wird das gesamte Kolon entfernt. Danach werden alle venösen Zuflüsse der Pfortader in Höhe des Pankreas ligiert, so dass die Pfortader bis in den Leberhilus frei ist. Der so präparierte Spenderdünndarm hängt jetzt lediglich an dem Gefäßstiel der Aorta und der Pfortader. Nun wird die Aorta proximal und distal des Abganges der Arteria mesenterica abgeklemmt, die Pfortader in Höhe des Leberhilus durchtrennt und das Gefäßbett des Dünndarmes mit kalter University of Wisconsin (UW)-Lösung gespült bis sich keine makroskopischen Blutreste mehr im Gefäßbett befinden. Im letzten Schritt wird das Darmlumen ebenfalls mit kalter UW-Lösung gespült und der Darm mit einem Aortasegment entnommen und bis zur Implantation in kalter UW-Lösung aufbewahrt (Dauer bis 60 min). Bei Behandlung des Transplantates mit dem Stat-1-Decoy-Oligonukleotid (Sequenz: CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG) oder dem entsprechenden mutierten Decoy-Oligonukleotid (Sequenz: CATGTTATGCAGACCGTAGTAAGTG), werden diese in Ringer-Lösung gelöst in die Arteria mesenterica infundiert (Volumen 3 ml, Endkonzentration 10 $\mu\text{mol/L}$) und erst unmittelbar vor der Anastomosierung mit Ringer-Lösung ausgewaschen.

Implantation

[0062] In Etherinhalationsnarkose wird das Abdomen in der Mittellinie eröffnet. Es werden die Aorta und Vena cava dargestellt und simultan abgeklemmt. Der Gefäßanschluß erfolgt End-zu-Seit in fortlaufender Nahttechnik mittels eines 8-0 Nylonfadens. Es werden das die Arteria mesenterica tragende Aortasegment an der infrarenale Aorta und die Pfortader an die infrarenale Vena cava anastomosiert. Nach Freigabe der Zirkulation wird das terminale Ileum des Spenderdarmes ebenfalls End-zu-Seit an das terminale Ileum des Empfängerdarmes mittels eines 6-0 Nylonfadens angeschlossen. So wird der vom Spenderdarm produzierte Mukus in die normale Passage des Tieres abgeleitet. Das orale Ende des Spenderdarmes wird mittels Ligatur verschlossen und das Abdomen zweischichtig fortlaufend verschlossen. Postoperativ erhalten die Tiere zur Analgesie Temgesic in das Trinkwasser.

Intravitalmikroskopie

[0063] Eine Beurteilung der Bedeutung der Leukozyten-Endothel-Interaktion für die Entzündungsreaktion ist nur durch intravitalmikroskopische Analysen möglich. Diese Methode ermöglicht eine Beobachtung des "Rollens und Adhärenzens" von Leukozyten am Endothel in vivo sowie eine quantitative Analyse mikrovaskulärer Parameter (Perfusion des Gewebes, Funktionelle Kapillardichte und Blutfluss).

[0064] Durchgeführt wird die Intravitalmikroskopie mit einem Axiotech Vario 100 Mikroskop von Zeiss (Göttingen), ausgestattet mit einer HBO 100 Quecksilber-Lampe für Epifluoreszenz-Messungen. Durch den Einsatz von 10x, 20x und 40x (Wasser-Immersionen) Objektiven werden Auflösungen von 243x, 476x und 933x erreicht. Die mikroskopischen Bilder werden mit einer CCD Video-Kamera (CF 8/1, Kappa) aufgenommen und für die spätere Auswertung auf einem Videoband festgehalten.

[0065] Sieben Tage nach Induktion der Colitis werden die Ratten in tiefer Diethylether-Narkose intravitalmikroskopisch untersucht. Um die Atmung zu erleichtern wird die Trachea kanüliert. Ein Polyurethan-Katheter wird zur permanenten Überprüfung des Blutdrucks und Vereinfachung der Applikation von Farbstoffen in die Arteria carotis gelegt. Die Körpertemperatur der Tiere wird durch eine beheizbare Platte konstant gehalten. Durch einen ventral-median angelegten Schnitt werden die Tiere eröffnet, das Colon descendens ausgelagert, antimesenterial ein kleiner Schnitt gesetzt und der Darm in einer speziellen Halterung zur Erleichterung des Mikroskopierens befestigt. Um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern, wird der Darm permanent mit Ringer-Lösung benetzt. Durch die Injektion von 0,8 ml 0,5% FITC- (Fluorescein-Isothiocyanat) gekoppeltem Dextran wird die intestinale Mikrozirkulation sichtbar gemacht. Um die Messungen statistisch abzusichern, werden mindestens zehn verschiedene Bereiche des entsprechenden Darmabschnittes untersucht. Quantifiziert werden die verschiedenen Parameter folgendermaßen: Der Perfusions-Index ergibt sich aus den perfundierten Mukosa-Arealen (in %) $+0,5 \times$ aller unregelmäßig perfundierten Mukosa-Areale (in %). Die funktionelle Kapillardichte wird durch eine Computerunterstützte Image-Analyse (CAP-IMAGE Software, Zeintl, Heidelberg) ermittelt. Zur Untersuchung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen werden die Leukozyten durch die Injektion von 0,2 ml 0,1% Rhodamine-6 G (Sigma, Heidelberg) markiert und postkapilläre Venolen in der Submukosa mikroskopiert. Als adhärenente Leukozyten ("Sticker") werden Leukozyten definiert, die in einem Gefäßsegment von 100 μm Länge mindestens 20 s am Endothel haften. Kalkuliert werden Zahl der Sticker/ mm^2 Endotheloberfläche. Die Endotheloberfläche ergibt sich aus der Oberflächenberechnung für einen Zylinder.

Dünndarmtransplantation-Ergebnis

[0066] Im Vergleich zu den syngenem Kontrolltieren ist z. B. die funktionelle Kapillardichte (ein Maß für die Perfusion der Submukosa) des Dünndarmtransplantats bei den allogenen transplantierten Tieren 7 Tage nach dem operativen Eingriff auf 4% (von 815 ± 21 auf $32 \pm 10 \text{ cm/cm}^2$, $n = 6$) abgesunken, die das mit dem mutierten Decoy-Oligonukleotid behandelte Organ empfangenen Tiere sind sogar verstorben ($n = 2$). Im Gegensatz dazu liegt die funktionelle Kapillardichte in den mit dem Stat-1-Decoy-Oligonukleotid behandelten Transplantaten zu diesem Zeitpunkt bei 48% der syngenem transplantierten Organe ($377 \pm 63 \text{ cm/cm}^2$, $n = 2$), d. h. die abstoßungsbedingte Verminderung der Darmperfusion und damit der Degeneration des Transplantates konnte um 50% reduziert werden. Ein vergleichbares Ergebnis ergibt sich bei der Fließgeschwindigkeit des Blutes in den Kapillaren.

<110> Hecker, Markus

5 <120> Modulation der Transkription pro-inflammatorischer
Genprodukte

10 <130> HEC-002

<140> xx

15 <141> 2000-11-29

<160> 26

20

<170> PatentIn Ver. 2.1

25 <210> 1

<211> 13

<212> DNA

30 <213> Künstliche Sequenz

<220>

35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

40 <400> 1

saaannnsaa ayy

13

45

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

50

<213> Künstliche Sequenz

<220>

55 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

60

<400> 2

yytttsnnnt tts

13

65

<210> 3		
<211> 13		
<212> DNA		5
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		10
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligonukleotid		
<400> 3		15
caaaagcgaa acc	13	
		20
<210> 4		
<211> 13		
<212> DNA		25
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		30
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligonukleotid		
<400> 4		35
ggtttcgctt ttg	13	
		40
<210> 5		
<211> 13		45
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		50
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligonukleotid		
<400> 5		55
gaaaagcgaa acc	13	
		60
<210> 6		
<211> 13		65

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

10 Oligonukleotid

<400> 6

15 ggtttcgctt ttc

13

<210> 7

20

<211> 13

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

25

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

30

Oligonukleotid

<400> 7

35

caaaagtga acc

13

<210> 8

40

<211> 13

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

45

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

50

Oligonukleotid

<400> 8

55

ggtttcactt ttg

13

<210> 9

60

<211> 13

<212> DNA

65

<213> Künstliche Sequenz

<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligonukleotid		5
<400> 9		
gaaaagtga acc	13	10
<210> 10		15
<211> 13		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		20
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		25
Oligonukleotid		
<400> 10		30
ggtttcactt ttc	13	
<210> 11		35
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		40
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		45
Oligonukleotid		
<400> 11		50
cagaaaagtg aaaccctg	18	
<210> 12		55
<211> 18		
<212> DNA		60
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		65
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligonukleotid		

<400> 12
cagggtttca cttttctg 18
5

<210> 13
10 <211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

15 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid
20

<400> 13
cagtttcaaa ttgaaactg 19
25

<210> 14
30 <211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

35 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid
40

<400> 14
45 cagtttcaat ttgaaactg 19

50 <210> 15
<211> 20
<212> DNA
55 <213> Künstliche Sequenz

<220>
60 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

65 <400> 15
caggaaaagt gaaaccgctg 20

<210> 16		
<211> 20		
<212> DNA		5
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		10
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligonukleotid		
<400> 16		15
cagcggtttc acttttcctg	20	
		20
<210> 17		
<211> 21		
<212> DNA		25
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		30
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligonukleotid		
<400> 17		35
gcagtttcaa attgaaactg c	21	
		40
<210> 18		
<211> 21		45
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		50
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligonukleotid		
<400> 18		55
gcagtttcaa tttgaaactg c	21	
		60
<210> 19		
		65

<211> 22
<212> DNA
5 <213> Künstliche Sequenz

<220>
10 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 19
15 ggaagcgaaa atgaaattga ct 22

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
25 <213> Künstliche Sequenz

<220>
30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 20
35 agtcaatttc attttcgctt cc 22

<210> 21
<211> 23
45 <212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 21
55 ggcagtttca aattgaaact gcc 23

<210> 22
65 <211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		
Oligonukleotid		5
<400> 22		
ggcagtttca atttgaaact gcc	23	10
<210> 23		15
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		20
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		25
Oligonukleotid		
<400> 23		30
cgagtgatgg gcatgttggc	20	
<210> 24		35
<211> 15		
<212> DNA		
<213> Künstliche Sequenz		40
<220>		
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		45
Oligonukleotid		
<400> 24		50
gattcggctg gtcgc	15	
		55
<210> 25		
<211> 16		
<212> DNA		60
<213> Künstliche Sequenz		
<220>		65
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:		

Oligonukleotid

5 <400> 25

taatccagat gagccc

16

10

<210> 26

<211> 17

15 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

20 <400> 26

ggagcgattc ggctggt

17

Patentansprüche

25

1. Ein Inhibitor der IRF-1-Expression und/oder -Aktivität als therapeutische Substanz.
2. Inhibitor nach Anspruch 1, wobei der Inhibitor ein doppelsträngiges DNA-Molekül ist und die IRF-1-Aktivität inhibiert.
3. Inhibitor nach Anspruch 2 mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 bis 21.
- 30 4. Inhibitor nach Anspruch 2 oder 3, wobei das doppelsträngige DNA-Molekül modifizierte Internukleotidbindungen aufweist.
5. Inhibitor nach Anspruch 1, wobei der Inhibitor ein Antisense-Oligonukleotid ist und die IRF-1-Expression inhibiert.
6. Inhibitor nach Anspruch 5 mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 23 bis 26.
- 35 7. Inhibitor nach Anspruch 5 oder 6, wobei das Antisense-Oligonukleotid modifizierte Internukleotidbindungen aufweist.
8. Verwendung eines Inhibitors der IRF-1-Expression und/oder -Aktivität zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder Therapie von chronischen (Transplantat-Arteriosklerose oder Vaskulopathie) oder akuten Transplantatabstoßungen, chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen, insbesondere Asthma bronchiale, atopische Dermatitis, Colitis ulcerosa, Morbus Crohn, Psoriasis und Sarkoidose, sowie Autoimmunerkrankungen, insbesondere Diabetes mellitus, multiple Sklerose, Kollagenosen (z. B. systemischer Lupus erythematodes), rheumatoide Arthritis und Vaskulitiden.
9. Ein Antisense-Oligonukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 23 bis 26.
10. Antisense-Oligonukleotid nach Anspruch 9, wobei das Antisense-Oligonukleotid modifizierte Internukleotidbindungen aufweist.
- 45 11. Ein doppelsträngiges DNA-Molekül mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 bis 21.
12. Doppelsträngiges DNA-Molekül nach Anspruch 11, wobei das doppelsträngige DNA-Molekül modifizierte Internukleotidbindungen aufweist.

50

 Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

- Leerseite -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 1

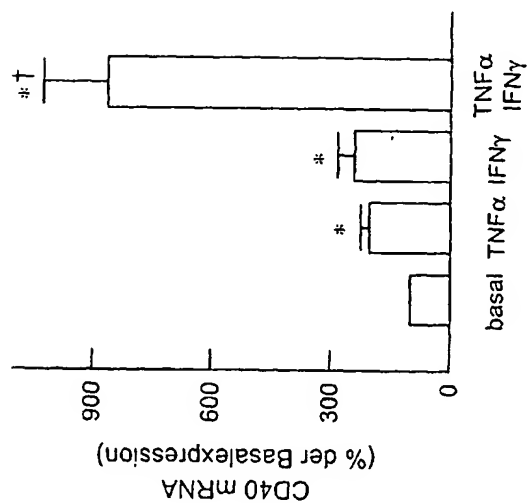


FIG. 2

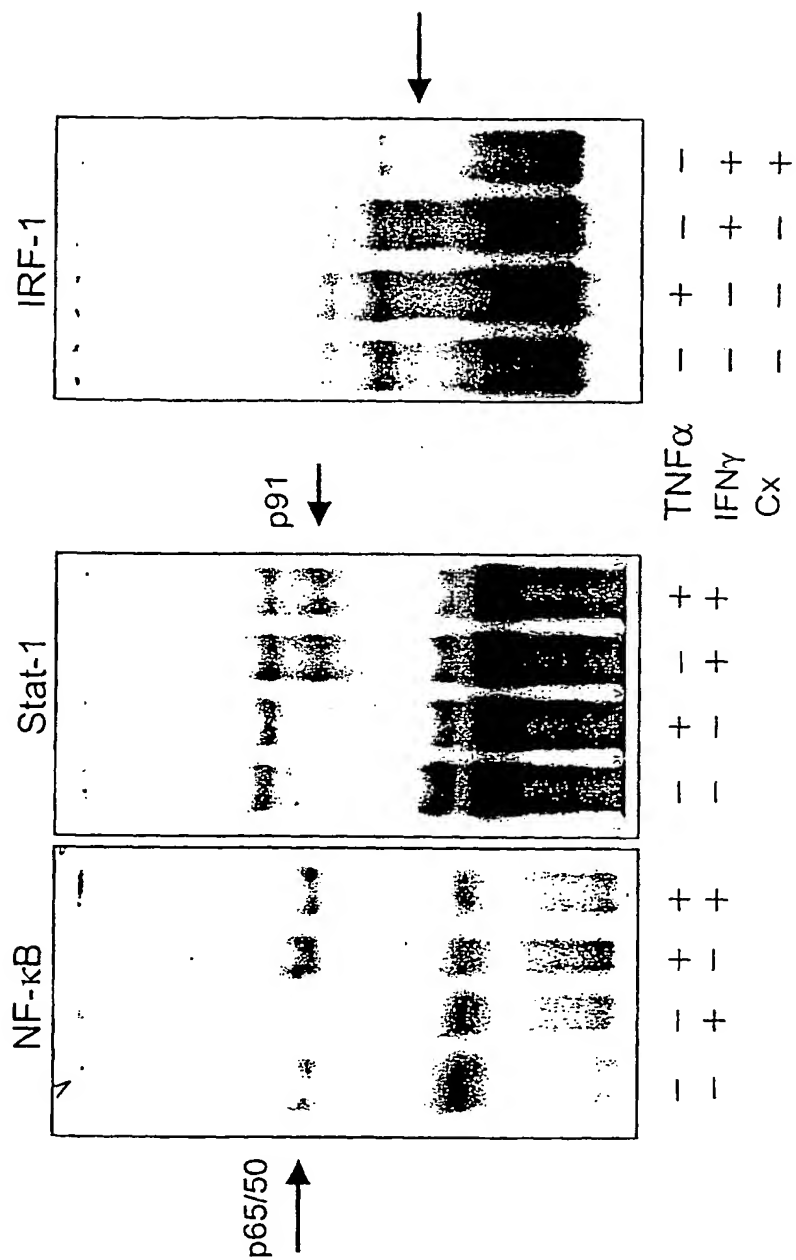


FIG. 3

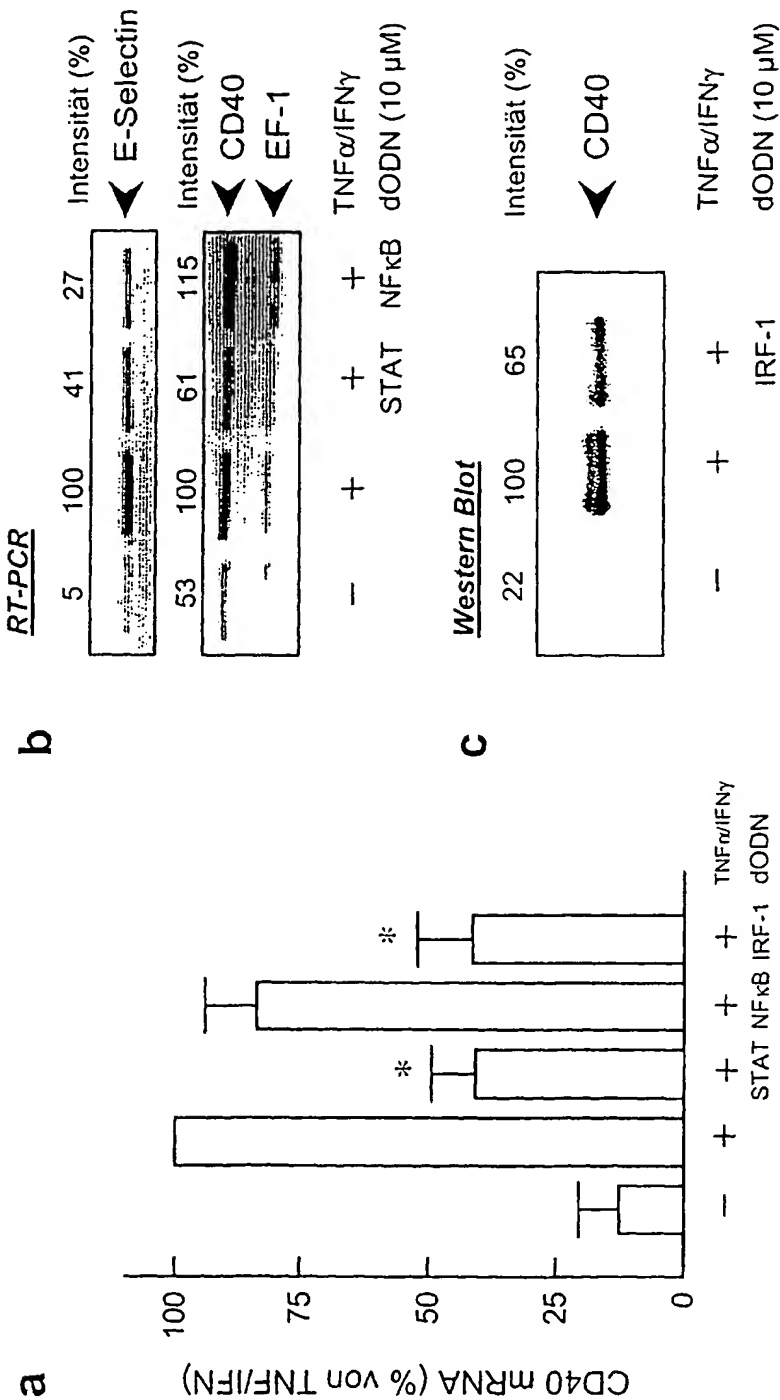


FIG. 4

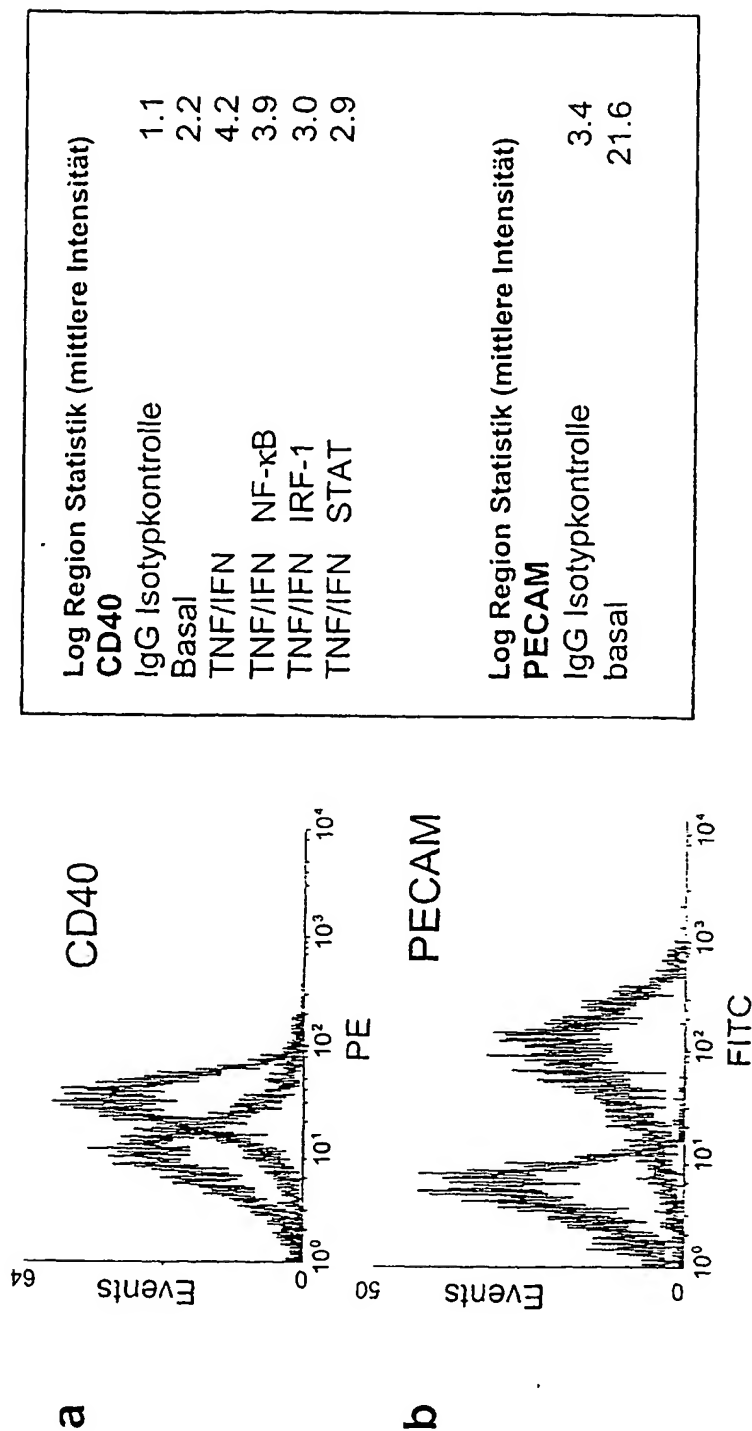


FIG. 5

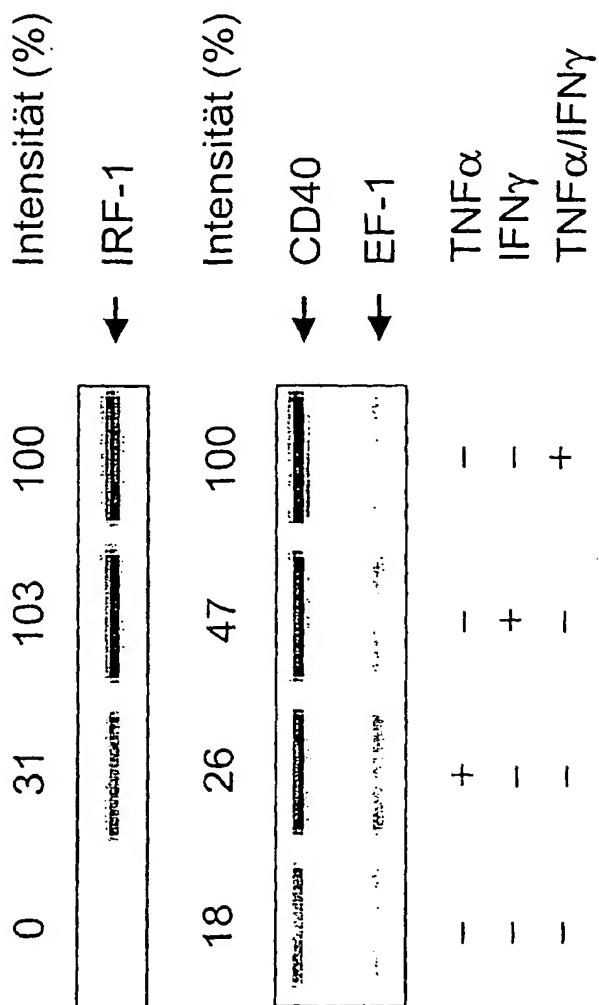
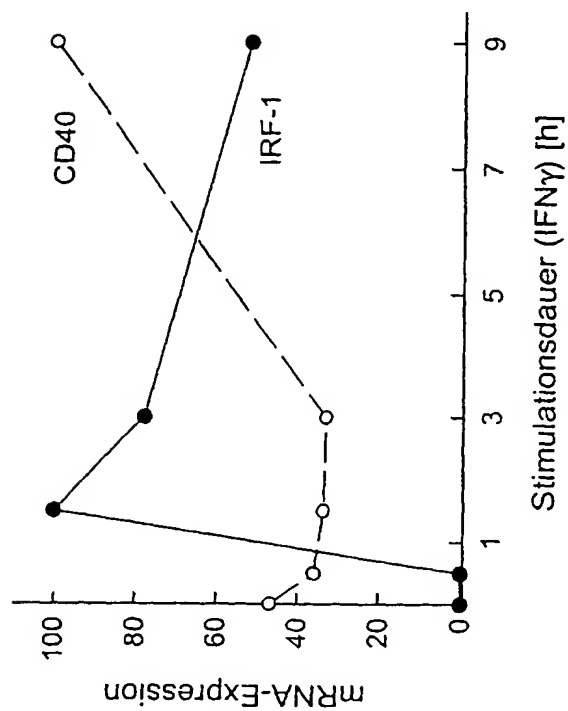


FIG. 6



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.